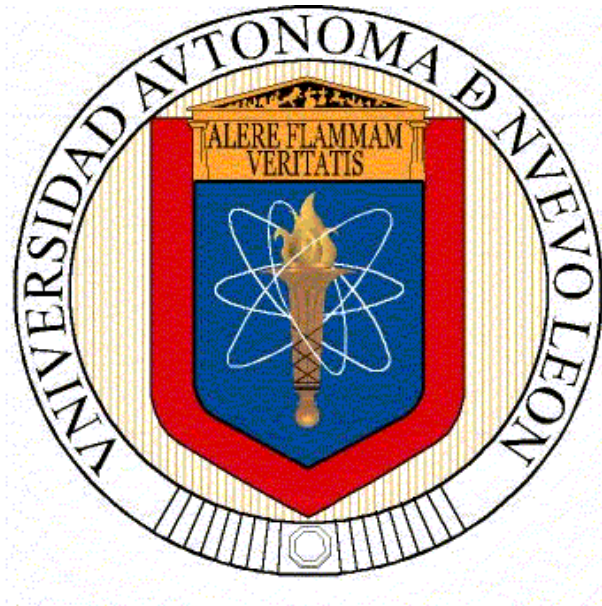


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



TESIS

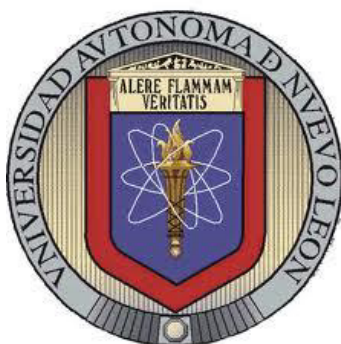
**“EFECTO CITOTÓXICO DE HIPOCLORITO DE SODIO Y
EDTA SOBRE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL”**

**POR
JESÚS ALEJANDRO QUIÑONES PEDRAZA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL
ÁREA DE ENDODONCIA**

OCTUBRE, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES



**“EFECTO CITOTOXICO DE HIPOCLORITO DE SODIO Y
EDTA SOBRE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL”**

Por:

CD, MOA. JESÚS ALEJANDRO QUIÑONES PEDRAZA

Como requisito para obtener el grado de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL
ÁREA DE ENDODONCIA

Octubre, 2015

INVESTIGADORES:

INVESTIGADOR PRINCIPAL: CD, MOA Jesús Alejandro Quiñones Pedraza

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Myriam Angélica De La Garza Ramos

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. Jorge Jaime Flores Treviño

ASESORES:

Asesor Metodológico: CD, MOA. Casiano Del Ángel Mosqueda

Asesor Estadístico: Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ENDODONCIA

**“EFECTO CITOTOXICO DE HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA SOBRE
CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL”**

Dr. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda.

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS SUPERIORES

Dr. Jorge Jaime Flores Treviño

COORDINADOR DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ENDODONCIA

**“EFECTO CITOTOXICO DE HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA SOBRE
CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL”**

Dra. Myriam Angélica De La Garza Ramos
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
CO-DIRECTOR DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ENDODONCIA

**“EFECTO CITOTOXICO DE HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA SOBRE
CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL”**

APROBACION DE TESIS

Los miembros del Jurado aceptamos la investigación y aprobamos el documento que avala la misma, como requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia.

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO.

Presidente

Secretario

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi querida madre Inés Pedraza por su incondicional apoyo, amor, consejos y comprensión. A ella, que gracias a su ejemplo como madre trabajadora me ha inspirado para superarme día a día no sólo en mi vida profesional, sino también como persona. Sus palabras de ánimo durante tantos momentos difíciles fueron un pilar sumamente importante para dejar las derrotas a un lado.

A mi querido padre Juan Quiñones, un hombre de valores, respeto y que definitivamente, sabe cómo llevar adelante a una hermosa y unida familia. A él, que me ha apoyado tanto, que me brinda su amor y de quien siempre recuerdo una frase que marcó mi vida desde la infancia, la cual cito: “Tus estudios serán como las armas en una guerra”.

A mi querido hijo Alejandro Daniel, por su apoyo y comprensión. Gracias a su inmenso cariño y a su hermosa sonrisa pude dejar a un lado momentos difíciles y muy dolorosos. Su mirada y su amor, fueron y siguen siendo totalmente una fuente de inspiración que ilumina mi camino hacia la superación como padre, profesionista y ser humano.

A mis hermanos Raúl, Laura y Gerardo, a quienes también agradezco por su paciencia y comprensión. Su cariño hacia mí es tanto, que me hace feliz. Nada sería igual sin sus bromas y comentarios graciosos.

A mi Directora de Tesis, la Dra. Myriam De La Garza Ramos y a mi Co-Director, el Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, quienes me brindaron enseñanza durante mi estancia en la residencia.

A la Dra. Elizabeth Madla y a la Dra. Mayra Martínez por su comprensión y sus palabras de aliento que nunca olvidaré. Gracias por depositar su confianza en

mí y brindarme apoyo cuando lo necesité. Sus consejos serán siempre un tesoro que llevaré en mi corazón.

A todos los maestros del Posgrado, porque de todos aprendí. De cada uno me llevo excelentes recuerdos, ya que tuve la oportunidad de conocerlos no sólo como profesionistas, también como amigos.

A mis compañeros de residencia, con quienes compartí tantos momentos chistosos y felices, nunca los olvidaré. Gracias hermanos por todo su apoyo.

Por supuesto, agradezco también a todas aquellas personas que dedican su trabajo a la investigación sobre Regeneración en Endodoncia. Sus artículos publicados brindan un tesoro invaluable: "Educación y Conocimiento"

Indice

1. RESUMEN	10
2. NOMENCLATURA	11
3. INTRODUCCIÓN	13
4. OBJETIVOS	15
5. HIPÓTESIS	16
6. ANTECEDENTES	17
6.1 Procedimiento regenerativo en endodoncia	17
6.2 Protocolo Clínico de los procedimientos regenerativos	18
6.3 Factores de crecimiento	19
6.4 Desinfección en un procedimiento de regeneración	20
6.5 NaOCl y EDTA: Dos soluciones comunmente utilizados durante la regeneración.....	20
6.6 Células Madre de Pulpa Dental (DPSCs)	21
6.7 Migración de DPSCs	22
6.8 Señales de regeneración secretadas por células de la pulpa.....	23
6.9 Otras células madre de origen dental	24
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
8. MATERIALES Y MÉTODOS	27
8.1 Universo de estudio	27
8.2 Tamaño de muestra.....	27
8.3 Criterios de selección	27
8.3.1 Criterios de inclusión	27
8.3.2 Criterios de exclusión	27
8.3.3 Criterios de eliminación	28
8.4 Materiales	28
8.5 Metodología	29
8.5.1 Cultivo celular	29
8.5.2 Hipoclorito de sodio y EDTA.....	31
8.5.3 Microscopía de contraste de fases	31

8.5.4 Evaluación de citotoxicidad por el método de Fluorescence Measure Citotoxicity Asay (FMCA).....	32
9. RESULTADOS	34
9.1 Tablas y Graficas.....	41
10. DISCUSION	47
11. CONCLUSIONES	50
12. REFERENCIAS.....	51

1. RESUMEN

Introducción. La presente investigación surge de la importancia que implica la irrigación en relación a la regeneración del complejo dentino-pulpar. En la actualidad, una gran cantidad de artículos han enfocado sus objetivos en el efecto antibacteriano de soluciones irrigantes, sin embargo, son pocas las investigaciones que evalúan el efecto de dichas soluciones sobre las células madre presentes en la pulpa dental. **Objetivo.** Evaluar el efecto citotóxico de hipoclorito de sodio y EDTA sobre células madre de pulpa dental *in vitro*. **Materiales y métodos.** Se utilizaron Células madre de pulpa dental cortesía de la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud. Para la evaluación de la citotoxicidad, se utilizó la solución de EDTA a concentraciones de 1.7%, 1%, 0.5% y 0.1% y NaOCl al 0.25%, 0.15%, 0.1% y 0.5% por triplicado. Ambas moléculas (EDTA y NaOCl) se incubaron con las células a 37° C, 5% de CO² en una atmosfera a 95% de humedad durante 3 y 24 horas. Los controles negativos fueron incubados con PBS. **Resultados.** En los resultados se observó una alta toxicidad del NaOCl frente a las DPSCs a 3 y 24 horas de exposición. Así mismo se observó que la combinación del NaOCl y el EDTA no disminuyó el efecto citotóxico sobre las células, a excepción de la combinación de EDTA .1% + NaOCl .05% la cual presentó un ligero aumento en la viabilidad celular. Por otra parte, todas las concentraciones evaluadas de la solución de EDTA fueron menos tóxicas cuando se incubaron durante 3 y 24 horas frente a las células. **Conclusiones.** De acuerdo a los resultados observados en el presente estudio podemos concluir lo siguiente: el NaOCl presentó alta citotoxicidad en todas sus concentraciones a las 3 y 24 horas de exposición, el EDTA presentó una mayor viabilidad a las 3 y 24 horas cuando se utilizó al 0.5% y 0.10%, la combinación del EDTA y NaOCl resultó menos citotóxica cuando se utilizó al 0.1% y 0.5% respectivamente a las 3 horas de exposición.

2. NOMENCLATURA

BMSCs: Células madre mesenquimales de la médula ósea

CHX: Clorhexidina

DMEM: Dulbelcco's Modified Eagle Medium

DPSCs: Células madre de pulpa dental

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMPs: Proteínas de la matriz extracelular

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FMCA: Ensayo de citotoxicidad por fluorometría

Hrs: Horas

IADR: International Association for Dental Research

In: Indiana

Inc: Incorporation

Mg/ml: Miligramo por mililitro

Min: Minutos

MI: Mililitro

Mm: Milimetro

MSC: Células madre mesenquimales

MTA: Mineral Trióxido Agregado

NaOCl: Hipoclorito de sodio

OK: Oklahoma

PBRG: Grupo de Biología Pulpar y Regeneración

PBS: Solución salina amortiguada por fosfatos

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

REPs: Procedimientos regenerativos en endodoncia

S1P: Esfingosin-1- fosfato

SCAPs: Células madre de la papila apical

SFB: Suero Fetal Bovino

TAP: Pasta triple antibiótica

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

3. INTRODUCCIÓN

La presente investigación surge de la importancia que implica la irrigación en relación a la regeneración del complejo dentino-pulpar. En la actualidad, una gran cantidad de artículos han enfocado sus objetivos en el efecto antibacteriano de soluciones irrigantes, sin embargo, son pocas las investigaciones que evalúan el efecto de dichas soluciones sobre las células madre presentes en la pulpa dental.

Según la literatura, células madre se encuentran ampliamente implicadas en los procedimientos regenerativos en endodoncia, a éstas se les atribuye su participación debido a su capacidad de supervivencia durante procesos infecciosos, así como de regenerar tejidos mediante su capacidad de proliferación y diferenciación. Existen reportes publicados en los que ya, en la década de los sesentas eran orientados hacia la regeneración del complejo dentino pulpar en estudio animal, pero fue en el año 2001 en el que por primera vez se reportó un caso clínico en humano relacionado a la regeneración del complejo dentino-pulpar. A partir de éste entonces surgen nuevas investigaciones, entre ellas, las relacionadas a la biología celular.

Debido a los favorables resultados que puede presentar un procedimiento regenerativo en endodoncia, éste, desde su inicio, surge como alternativa a los procedimientos que comúnmente eran utilizados para tratar dientes inmaduros con diagnóstico de necrosis pulpar, a los cuales se incluyen la “Apexificación” mediante el uso de Hidróxido de calcio y la colocación de una “Barrera Apical”. Aunque resultan funcionales y reparan lesiones periapicales, estos dos últimos tratamientos no tienen la capacidad de inducir el continuo desarrollo radicular después de una necrosis pulpar, que a diferencia de los procedimientos regenerativos, si lo hacen.

Distintos protocolos clínicos han sido utilizados y propuestos para realizar procedimientos regenerativos, en los cuales se incluyen una variedad de soluciones irrigantes, pastas antibióticas, incluso el hidróxido de calcio, así como distintos cementos selladores que promuevan a un mejor resultado. Una amplia discusión surgió con respecto a los materiales y métodos a utilizar en este tratamiento. Sin embargo, poco a poco se han ido descartando propuestas e incluyendo nuevas conforme a hallazgos clínicos y de laboratorio.

Con respecto a las investigaciones relacionadas a la irrigación en los procedimientos de regeneración, éstos siguen en pie. Aunque ya se ha logrado un gran avance, hoy en día se siguen investigando sus concentraciones, tiempo de exposición en los tejidos y sus combinaciones con otras soluciones.

Esta investigación se enfoca a dos soluciones irrigantes propuestas actualmente para realizar procedimientos de regeneración y el análisis de su efecto sobre las células madre de la pulpa dental. De ésta manera se busca contribuir científicamente a los avances ya realizados de regeneración, proponiendo con los resultados un protocolo de irrigación útil en el tratamiento.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto citotóxico de hipoclorito de sodio y EDTA sobre células madre de pulpa dental *in vitro*

Objetivos específicos:

- Determinar el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad de células madre de pulpa dental tratadas con Hipoclorito de sodio y EDTA mediante la prueba FMCA.
- Analizar cambios morfológicos en células madre de pulpa dental (DPSCs) expuestas a hipoclorito de sodio y EDTA mediante microscopía de contraste de fases.
- Determinar la concentración óptima de Hipoclorito de sodio en combinación con EDTA para realizar un tratamiento regenerativo.

5. HIPÓTESIS

El efecto citotóxico de hipoclorito de sodio y EDTA sobre células madre de pulpa dental es “concentración-tiempo” dependiente.

6. ANTECEDENTES

6.1 Procedimiento regenerativo en endodoncia

La pérdida de un diente inmaduro permanente en pacientes jóvenes con dentición mixta puede ser devastante, llevando a la pérdida de función, maloclusión y un desarrollo maxilofacial inadecuado (Diogenes *et al.*, 2014). Regularmente, los dientes inmaduros con diagnóstico de necrosis pulpar eran sólo tratados con procedimientos de apexificación, usando hidróxido de calcio a largo tiempo (Selden, 2002) o la colocación inmediata de una barrera apical con Trioxóxido Mineral Agregado (MTA) (Holden *et al.*, 2008). Aunque éstos tratamientos a menudo resuelven los signos y síntomas de una lesión periapical, proporcionan poco o nulo beneficio en la continuación de un desarrollo radicular (Bose *et al.*, 2009).

Los Procedimientos Regenerativos en Endodoncia (REPs) han emergido como una alternativa de tratamiento para los dientes inmaduros permanentes con necrosis pulpar, que en adición a la reparación de la periodontitis apical, promueven la regeneración de las funciones fisiológicas normales de la pulpa. Esto incluye la continuación del desarrollo radicular, inmunocompetencia y nocicepción (Diogenes *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, irrigantes y medicamentos han sido elegidos por su máximo efecto antimicrobiano sin la consideración de su efecto sobre las células madre y el microambiente dentinario (Diogenes *et al.*, 2014).

6.2 Protocolo Clínico de los procedimientos regenerativos

A través del tiempo se han realizado distintos casos de regeneración con una variedad de protocolos clínicos, sin embargo durante el más reciente Symposium del Grupo de Biología Pulpar y Regeneración (PBRG) de la International Association for Dental Research (IADR) realizado en la ciudad de San Francisco, se mencionaron los avances realizados en investigación y casos clínicos de regeneración pulpar. Así mismo se estableció un protocolo clínico para realizar los procedimientos de regeneración en endodoncia (Diogenes *et al.*, 2014), el cual es descrito de la siguiente manera:

Procedimientos durante la primera visita:

1. Consentimiento informado, incluyendo la explicación de riesgos y de tratamientos alternativos.
2. Tras asegurarse de una anestesia local adecuada, realizar aislamiento con goma dique.
3. Se realiza el acceso al sistema de conductos y la longitud de trabajo es determinada (posicionando radiográficamente una lima a 1 mm del final de la raíz).
4. Se irriga lentamente el sistema de conductos radiculares, primero con 1.5% de Hipoclorito de sodio (NaOCl) (20 ml/conducto por 5 min) y luego se irriga con 17% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (20 ml/conducto por 5 min), con aguja para irrigar a 1 mm del final de la raíz.
5. Se secan los conductos con puntas de papel.
6. Colocar hidróxido de calcio o pasta antibiótica a una concentración no mayor de 1 mg/ml.
7. Restaurar temporalmente el acceso.

Durante la segunda visita (de 2 a 4 semanas después de la primera visita), se realiza lo siguiente:

1. Primeramente se realiza una examinación clínica para asegurarse de que no exista sensibilidad a la palpación o percusión de moderada a severa. Si se observa sensibilidad, inflamación o un tracto sinuoso, se repite el tratamiento realizado durante la primera visita. En este punto, el clínico debe elegir colocar la Pasta Triple Antibiótica (TAP) (a no más de 11 um de cada droga/mL).
2. Tras asegurarse de una adecuada anestesia local con mepivacaína al 3% sin epinefrina, se realiza aislamiento con goma dique.
3. Se realiza el acceso al sistema de conductos radiculares; se remueve el medicamento intraconducto mediante irrigación con 17% de EDTA (30 mL/conducto por 10 min).
4. Se secan los conductos con puntas de papel
5. Se induce un sangrado con una lima tipo K #25 pasándose 2 mm del foramen apical con el objetivo de tener el conducto totalmente lleno con sangre a el nivel de la unión cemento-esmalte.
6. Una vez que se haya formado el coagulo, se coloca una pieza de Collaplug (Zimmer dental inc, Warsaw, IN) cuidadosamente encima del coagulo de sangre para que sirva como matriz interna y así colocar aproximadamente 3 mm de MTA blanco (Dentsplay, Tulsa, OK).
7. Colocar una capa de 3 a 4 mm de ionómero de vidrio sobre el MTA y fotocurarlo por 40 seg.
8. Colocar una restauración con composite reforzado sobre el ionómero de vidrio.
9. Realizar un seguimiento del caso por 3 y 6 meses, posteriormente anualmente por un total de 4 años.

6.3 Factores de crecimiento

Durante la dentinogénesis, los factores de crecimiento son atrapados en la matriz de dentina y pueden ser después liberados mediante desmineralización.

Su efecto en la migración, proliferación y diferenciación de células madre pulpares puede ser benéfico para las terapias de regeneración en endodoncia (Galler *et al.*, 2015).

6.4 Desinfección en un procedimiento de regeneración

El tratamiento de regeneración en endodoncia generalmente comienza con la desinfección química de los conductos radiculares con una mínima o nula instrumentación, seguido por la colocación de medicamentos intraconductos. Dentro de los medicamentos que han sido utilizados en casos clínicos reportados se encuentran la TAP compuesta por (ciprofloxacino/metronidazol/minociclina), la pasta doble antibiótica (ciprofloxacino/metronidazol), el hidróxido de calcio, entre otros. El tiempo recomendado de la colocación de los medicamentos varía dependiendo los signos y síntomas de los pacientes, usualmente toma de 2-4 semanas (Diógenes *et al.*, 2013). En la segunda cita, en ausencia de signos y síntomas de la infección, el tratamiento continúa con la remoción de los medicamentos, inducción del sangrado y restauración coronaria (Althumairy *et al.*, 2014).

6.5 NaOCl y EDTA: Dos soluciones comunmente utilizados durante la regeneración

La desinfección de los conductos radiculares, es un paso crucial en los procedimientos regenerativos en endodoncia (Martin *et al.*, 2014). Varios protocolos clínicos han sido reportados para desinfectar los conductos radiculares en estos procedimientos, entre los irrigantes más comúnmente utilizados se encuentran el NaOCl, EDTA y la clorhexidina (CHX) (Banch and Trope 2004; Jung *et al.*, 2008; Petrino *et al.*, 2010; Shin, 2009). Sin embargo,

la clorhexidina ha resultado ser altamente citotóxica (Trevino *et al.*, 2011), por lo que muchos clínicos han decidido retirarla del protocolo.

6.6 Células Madre de Pulpa Dental (DPSCs)

Las DPSCs posnatales fueron primeramente aisladas de dientes humanos (Gronthos *et al.*, 2000). Son en gran parte derivadas de la cresta neural, las cuales expresan genes los cuales también están presentes en células madre embionarias, pero carecen de expresión de genes mesodérmicos. Dependiendo del medio de cultivo, éstas pueden diferenciarse en odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, neuronas y células musculares. Las DPSCs implantadas con fosfato de tricalcio/Hap, se diferencian en células similares a odontoblastos, las cuales producen estructura similar a dentina (Dimitrova-Nakov *et al.*, 2014).

Las poblaciones de DPSCs exhiben propiedades similares a las células madre mesenquimales (MSCs), tienen la habilidad de formar colonias *in vitro* y expresan marcadores osteoblasticos, adipogénicos, condrogénicos e incluso neuronales (Gronthos *et al.*, 2000; Batouli *et al.*, 2003; Huang, 2012; Shi *et al.*, 2001).

Estas células comparten muchas similitudes con las MSCs de la médula ósea (BMSCs), las cuales son las células madre estromales más estudiadas. Más de 4000 genes humanos están expresados en ambas poblaciones celulares (Shi *et al.*, 2001). Las poblaciones de DPSCs también expresan diferentes paneles de marcadores de superficie usados para caracterizar células madre hematopoyéticas de la médula ósea (Huang *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que las DPSCs y las BMSCs no tienen el mismo origen embrionario (Gronthos *et al.*, 2002), se piensa que las DPSCs contribuyen a la formación de dentina de reparación y que corresponden a poblaciones heterogéneas de células precursoras o que representan distintas

etapas de diferenciación a lo largo del linaje odontoblástico (Dimitrova-Nakov *et al.*, 2014).

Las DPSCs están implicadas en la reparación pulpar (Huang, 2012), sin embargo, no existe una demostración formal de que las DPSCs son las células reclutadas para la formación de dentina reparativa en respuesta a una injuria (Dimitrova-Nakov *et al.*, 2014).

6.7 Migración de DPSCs

La migración celular es necesaria para el mantenimiento homeostático tisular y para la regeneración de órganos y tejidos (Gilbert, 2003). Las células deben de migrar a los sitios en los que su función es requerida, de otra manera la regeneración y desarrollo de órganos funcionales sería imposible (Singer and Clark 1999). Inversamente, la migración celular no regulada puede ocasionar el desarrollo de un número de patologías, incluyendo metástasis de tumor, inflamación crónica y varias disfunciones en la respuesta inmune (Luster *et al.*, 2005). Las poblaciones de DPSCs son conocidas por responder a la injuria dental proliferando, migrando y diferenciándose para reemplazar odontoblastos perdidos, llevando a la síntesis y secreción de dentina terciaria (Qvist, 1975).

La matriz dentinaria es un reservorio de quimioatrayentes secretados por odontoblastos y fibroblastos. Los quimioatrayentes potenciales incluyen al factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Se cree que éstos proporcionan señales involucradas en la proliferación, diferenciación y reclutamiento de células pulpares al sitio de la injuria para iniciar la regeneración tisular (Smith *et al.*, 2001; Magloire *et al.*, 2001). Alternativamente, el mediador esfingolipídico transmitido por sangre y el esfingosin-1- fosfato (S1P) presentan funciones importantes durante la inflamación y la reparación de

una herida, tales como la diferenciación, proliferación, supervivencia, angiogénesis y migración celular (Stradner *et al.*, 2008).

Las células son conocidas por responder a su ambiente local usando vías de señalización, en particular por responder a propiedades bioquímicas de proteínas de la matriz extracelular (EMPs)(Larsen *et al.*, 2006). Las complejas interacciones de células con las EMPs juegan un papel crucial en la mediación y regulación de adhesión celular, migración, morfogénesis, homeostasis tisular, tumorigénesis y en la reparación de una herida (Berrier and Yamada 2007). Las principales EMPs son el colágeno, laminina y la fibronectina (Shiba *et al.*, 1998). La laminina es esencial para la diferenciación odontoblástica (Yuasa *et al.*, 2004). La fibronectina promueve la diferenciación y el crecimiento ameloblástico (Tabata *et al.*, 2003). El colágeno es la EMP más ubicua, regula la proliferación y diferenciación (Paralkar *et al.*, 1991).

6.8 Señales de regeneración secretadas por células de la pulpa

Las preparaciones cavitarias profundas o las lesiones por caries pueden ocasionar destrucción odontoblástica. Sin embargo, una nueva generación de células similares a odontoblastos es responsable de la aposición de dentina de reparación (Fitzgerald *et al.*, 1990).

La secreción de dentina de reparación es un proceso complejo que requiere la presencia de células progenitoras, así como de moléculas de señalización para su proliferación y diferenciación. Los factores de crecimiento liberados bajo lesiones por caries, juegan un papel importante en la secreción de dentina de reparación; el TGF- β 1, FGF-2 y el BMP-2 y BMP-4 parecen estar involucrados en la proliferación y diferenciación de las DPSCs (Martin, 1997; Shiba *et al.*, 1995).

Se han realizado investigaciones de la actividad secretoria de los fibroblastos pulpares y de células endoteliales, encontrando aspectos

interesantes relacionados a sus funciones bajo condiciones normales y patológicas. Se ha demostrado que los fibroblastos pulpares aislados de terceros molares humanos secretan bFGF, VEGF y factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) *in vitro*. Cuando éstas células fueron estimuladas por injurias traumáticas, su secreción de factores de crecimiento incrementó significativamente, y éste incremento fue observado 6 horas después de la injuria (Tran-Hung *et al.*, 2008). Los mismos resultados fueron observados con células endoteliales, las cuales secretan ambos (VEGF y FGF) sin ninguna estimulación (About, 2011).

Después de una injuria fisiológica a la capa endotelial celular, un incremento significativo de factores de crecimiento fue observado dentro de las horas de la injuria. Interesantemente, esto revela que la injuria por sí misma indujo una modificación del microambiente mediante la secreción de factores de crecimiento. En un intento para entender las consecuencias de esta secreción en el proceso de regeneración pulpar, un sistema de cultivo permitió la investigación de las consecuencias de una injuria física en la neoangiogenesis *in vitro*. Después de realizar injurias físicas a los fibroblastos pulpares, el medio de cultivo con los factores solubles fue recolectado y aplicado sobre el cultivo de células endoteliales. Sorpresivamente, las células endoteliales comenzaron a organizarse en estructuras “tubulares” cerradas correspondientes a la neoangiogenesis *in vitro* (Tran-Hung *et al.*, 2006)

6.9 Otras células madre de origen dental

En adición a las DPSCs, otras células madre han sido obtenidas del tejido dental humano (de dientes deciduos y de la parte apical de la papila) (Ema and Suda 2012) y de tejidos periodontales (gingiva, cemento, hueso alveolar y del ligamento periodontal) (Miura *et al.*, 2003). Así mismo, también se han aislado del folículo dental (Dimitrova-Nakov *et al.*, 2014).

Las células madre dentales son consideradas una población de células similares a las células madre mesenquimales, por lo tanto, los marcadores que han sido utilizados para identificar las MSCs fueron también utilizados para aislar las células madre dentales (Sonoyama *et al.*, 2008) Tanto las células madre dentales y no dentales comparten una alta tasa de proliferación y habilidad de multidiferenciación, ambas pueden estar implicadas en el desarrollo de la regeneración dental (Gronthos *et al.*, 2000; Huang, 2012; Huang *et al.*, 2009).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se ha demostrado que las células madre de pulpa dental tienen la capacidad de diferenciación odontoblástica, sugiriendo que éstas pueden desempeñar un papel importante en la ingeniería tisular. Además, que las soluciones irrigantes más comúnmente utilizadas en los procedimientos de Regeneración en Endodoncia son el NaOCl y EDTA. Por lo anteriormente mencionado se plantea lo siguiente:

¿Cuál es el efecto de NaOCl y EDTA sobre células madre de pulpa dental de cultivo primario?

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Universo de estudio

Premolares extraídos de humanos

8.2 Tamaño de muestra

N= 20

8.3 Criterios de selección

8.3.1 Criterios de inclusión

- Premolares humanos de pacientes entre 18-25 años de edad.
- Premolares sin caries
- Premolares con integridad coronal y radicular

8.3.2 Criterios de exclusión

- Piezas tratadas endodónticamente
- Dientes con conductos calcificados
- Dientes fracturados

8.3.3 Criterios de eliminación

- Dientes con escaso tejido pulpar

8.4 Materiales

- Buffer de fosfatos (PBS 1X)
- Tubos estériles 50 ml (Corning)
- Tubos estériles 15 ml (Corning)
- Suero fetal bovino (FBS) (Gibco)
- DULBECO MODIFIED EAGLE MEDIUM DMEM-F12 (Gibco)
- Coctel penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich)
- Placas negras de 96 pozos tratadas para cultivo celular (Corning)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Puntas para pipetas 100 ul y 1,000 ul
- Canaletas estériles (Invitrogen)
- Hipoclorito de sodio 5.25%
- EDTA (Sigma- Aldrich)
- Microscopio Axioinvert M200 (Zeiss)
- Lector de placas GloMax (Milenyi)
- Frascos para cultivo celular de 25 cm² (Corning)
- Formalina amortiguada (Sigma-Aldrich)

8.5 Metodología

8.5.1 Cultivo celular

Se utilizaron DPSCs cortesía de la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), las cuales fueron descongeladas utilizando la técnica de descongelación rápida en baño maría a 37°C durante 2 min hasta obtener una solución acuosa, inmediatamente las células fueron colocadas en un tubo estéril de 15 ml y se completó a volumen de 10 ml utilizando PBS, esto con el objetivo de disminuir la toxicidad celular provocada por el Dimetil Sulfoxido (DMSO) que fue utilizado como crioprotector durante la congelación del vial a -196° C. Posteriormente se realizó una homogenización gentil de la muestra utilizando una pipeta de 1000 ul y una centrifugación a 1200 rpm durante 10 min a 25° C, éste procedimiento se repitió 2 veces haciendo lavados extensivos con PBS.

El botón celular obtenido en la centrifugación se reconstituyó con medio de crecimiento completo compuesto de Dulbelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), suero fetal Bovino (SFB) 10% y un coctel de penicilina-estreptomicina como antibióticos. La muestra fue sembrada en frascos de 25 cm² con medio de crecimiento completo y mantenido en una atmosfera a 37 °C (Figura 1.1) con 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 3 días hasta completar un 70 % de confluencia celular.



Figura 1.1 Células mantenidas a 37°C durante la exposición a cada solución.

Posteriormente las células fueron desprendidas de la superficie del frasco utilizando tripsina/EDTA 0.025% en incubación a 37° C durante 5 min, inmediatamente después se inactivó la tripsina/EDTA utilizando medio de crecimiento completo. Las células fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer, para finalmente sembrar a una densidad de 15,000 células por pozo en una placa para cultivo celular negra de 96 pozos (Figura 1.2) Estas placas fueron mantenidas en la misma atmosfera durante 24 horas.

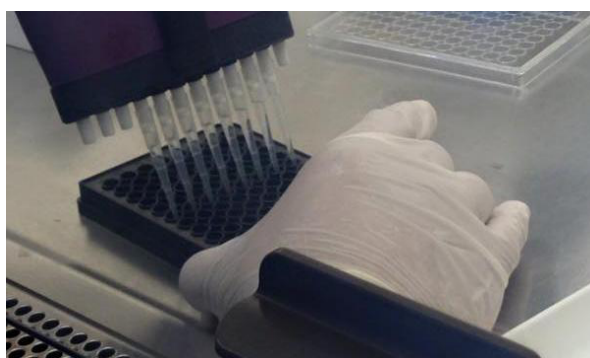


Figura 1.2 Células madre de pulpa dental cultivadas en placas de 96 pozos

8.5.2 Hipoclorito de sodio y EDTA

Para la evaluación de la citotoxicidad, el EDTA se colocó en cada pozo por triplicado a concentraciones finales de 1.7%, 1%, 0.5% y 0.1%. Al mismo tiempo el NaOCl fue también colocado en concentraciones finales de 0.25%, 0.15%, 0.1% y 0.5% por triplicado, los controles negativos fueron incubados con PBS. Ambas moléculas (EDTA y NaOCl) se incubaron con las células a 37° C, 5% de CO² en una atmosfera a 95% de humedad durante 3 y 24 hrs.

8.5.3 Microscopía de contraste de fases

Terminado los tiempos de incubación (3 y 24 hrs) las células fueron lavadas 3 veces utilizando PBS y posteriormente fijadas en formalina amortiguada al 10% durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células, se realizó un lavado con PBS y se colocaron 50 µl de PBS. Finalmente las placas de 96 pozos fueron observadas en contraste de fases en aumento 10x en un microscopio Axioinvert M200 (Zeiss) para registrar las micrografías correspondientes a los diferentes tratamientos. (Figura1.3)

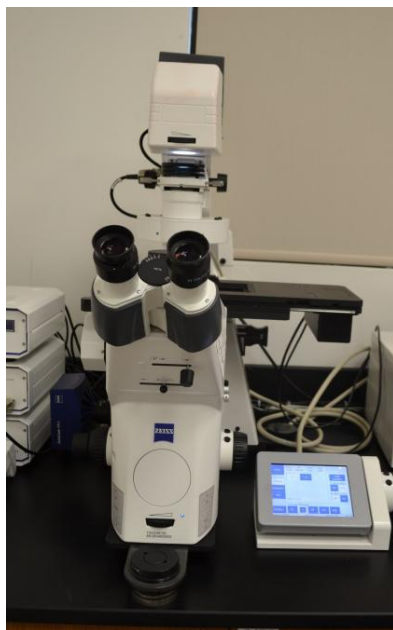


Figura 1.3 Microscopio Axioinvert M200 (Zeiss)

8.5.4 Evaluación de citotoxicidad por el método de Fluorescence Measure Citotoxicity Asay (FMCA)

Terminados los tiempos de incubación, se determinó la citotoxicidad mediante el método de FMCA descrito por Tal persona et al. Brevemente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente se incubaron con fluorescein diacetate (FDA) a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min a 37°C en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una lectura en fluorescencia a 495 nm en el lector de placas GloMax (Figura 1.4) para determinar el porcentaje de viabilidad celular posterior a la incubación con las moléculas.



Figura 1.4 Lector de placas GloMax

9. RESULTADOS

En los resultados se observó una alta toxicidad del NaOCl frente a las DPSCs a 3 y 24 horas de exposición. Así mismo se observó que la combinación del NaOCl y el EDTA no disminuyó el efecto citotóxico sobre las células, a excepción de la combinación de EDTA .1% + NaOCl .05% la cual presentó un ligero aumento en la viabilidad celular. Por otra parte, todas las concentraciones evaluadas de la solución de EDTA fueron menos tóxicas cuando se incubaron durante 3 y 24 hrs frente a las células. Dichos resultados se describen en las siguientes figuras, tablas y gráficas:

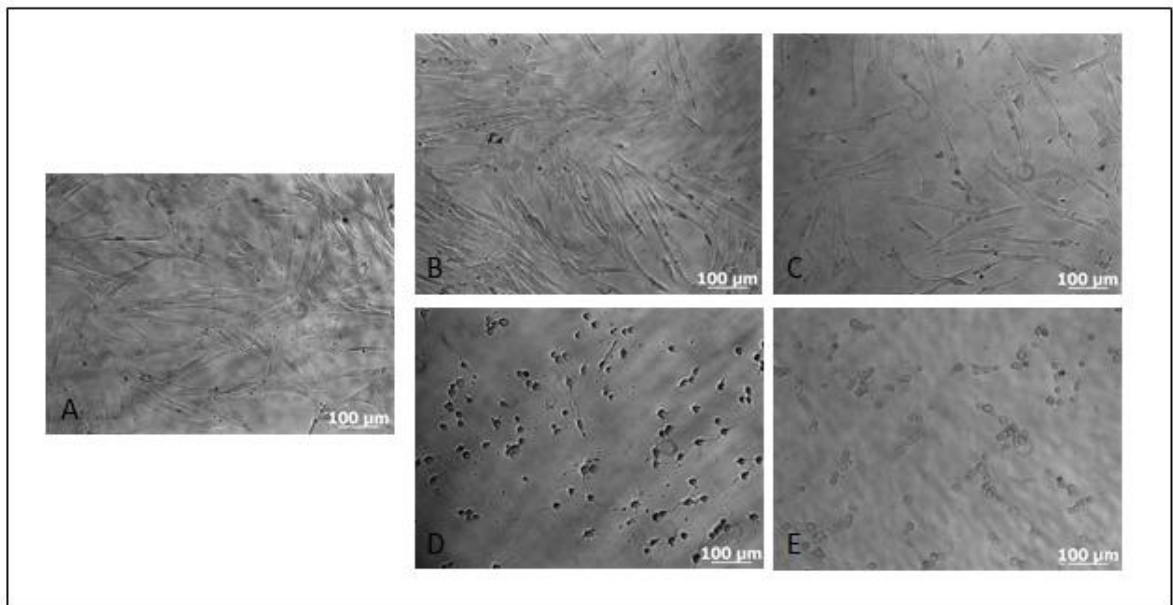


Figura 2.1 Imagen microscópica de grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con EDTA a las 3 horas de exposición. A) Grupo control; B) EDTA 0.1%; C) EDTA 0.5%; D) EDTA 1%; E) EDTA 1.7%

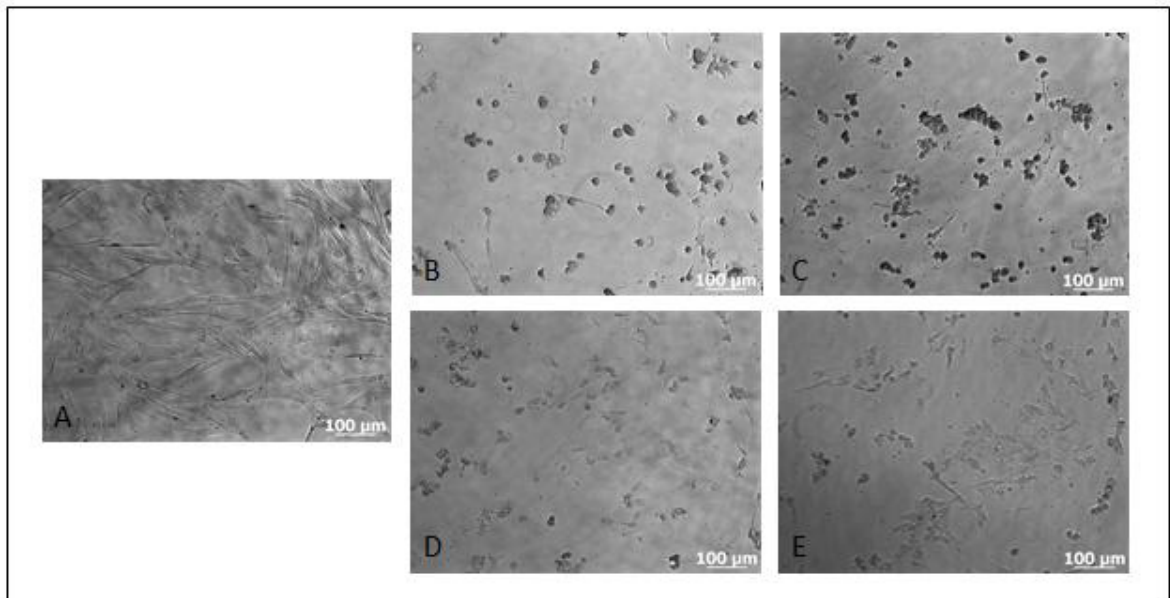


Figura 2.2 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con NaOCl a las 3 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

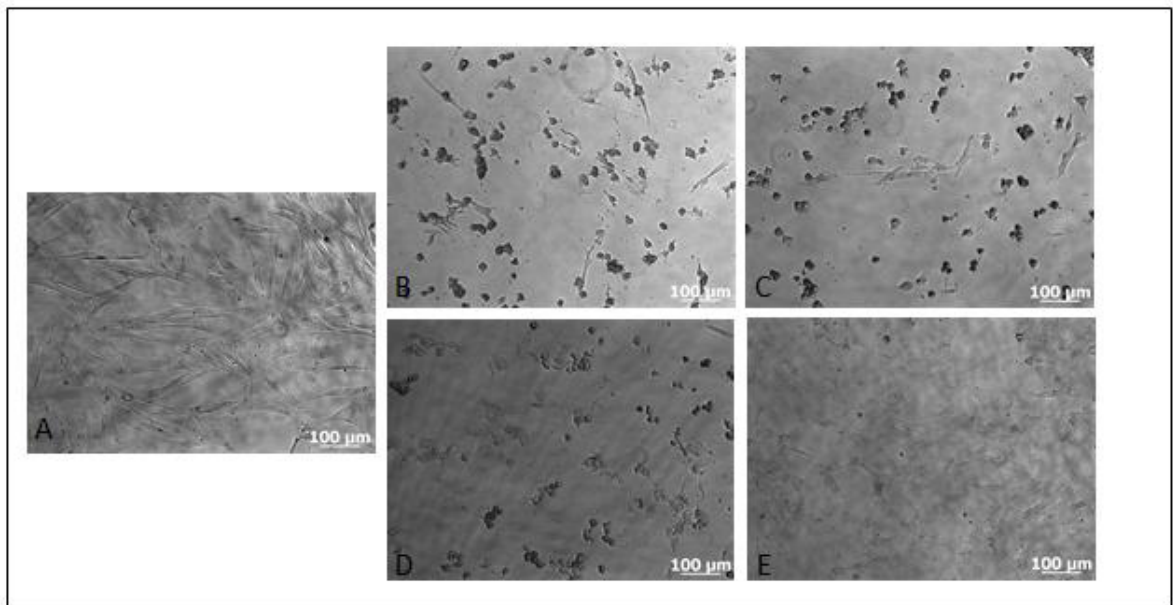


Figura 2.3 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 0.1% y distintas concentraciones de NaOCl a las 3 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

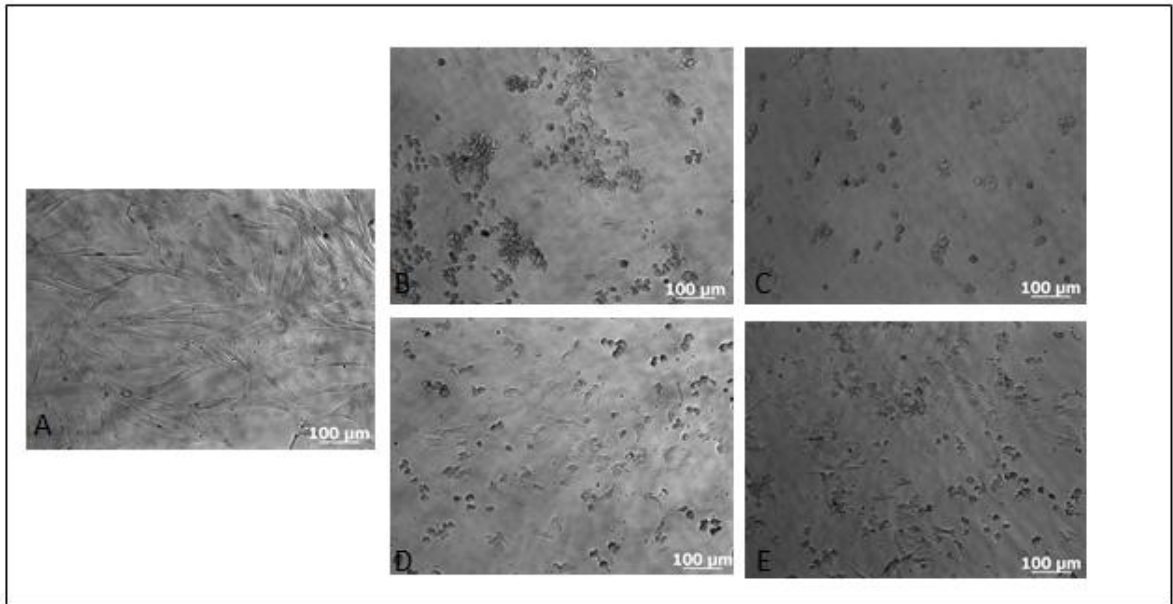


Figura 2.4 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 0.5% y distintas concentraciones de NaOCl a las 3 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

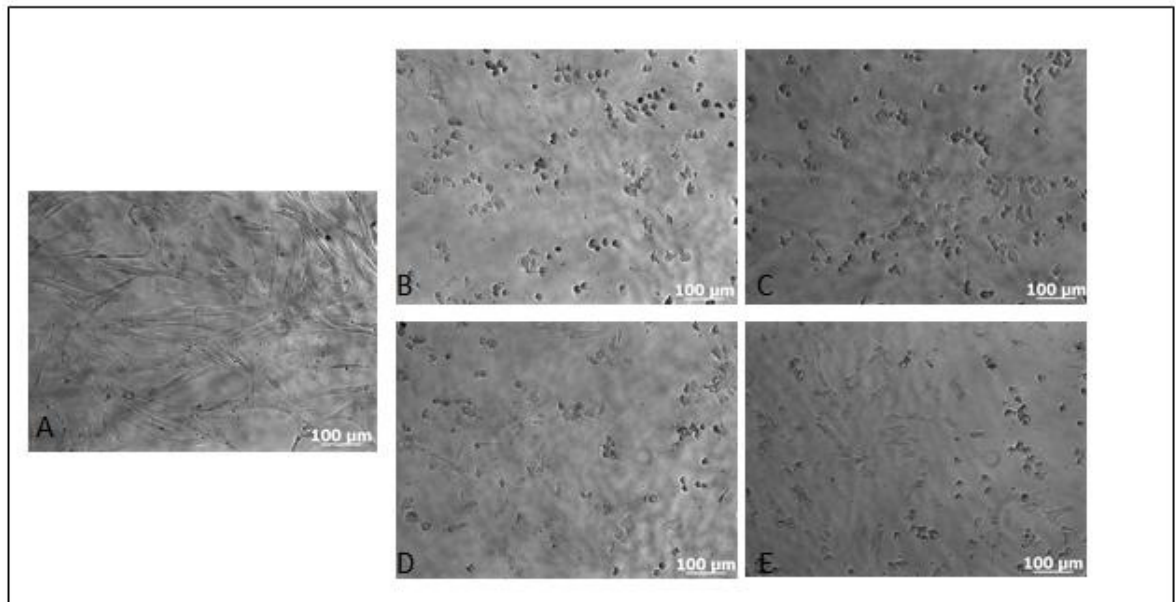


Figura 2.5 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 1% y distintas concentraciones de NaOCl a las 3 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

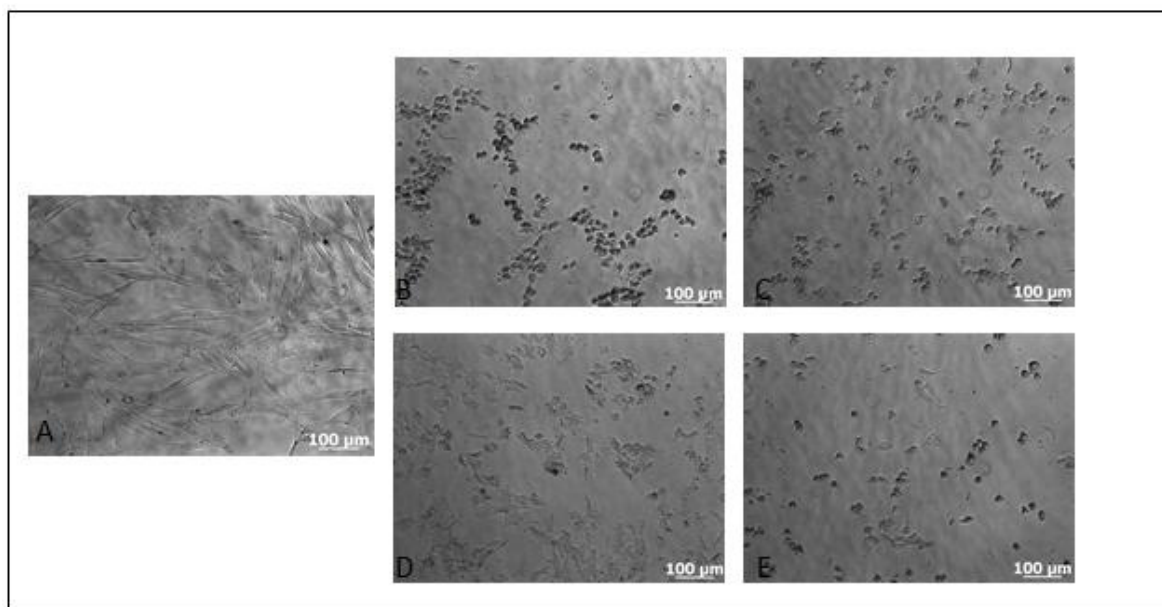


Figura 2.6 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 1.7% y distintas concentraciones de NaOCl a las 3 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

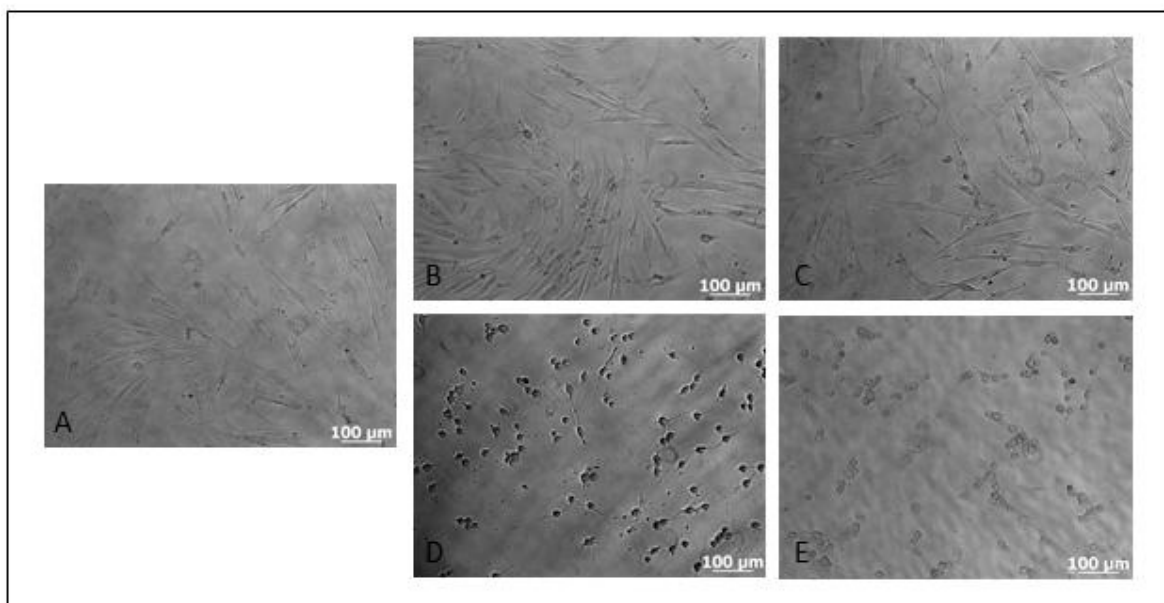


Figura 2.7 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con EDTA a las 24 horas de exposición. A) Grupo control; B) EDTA 0.1%; C) EDTA 0.5%; D) EDTA 1%; E) EDTA 1.7%

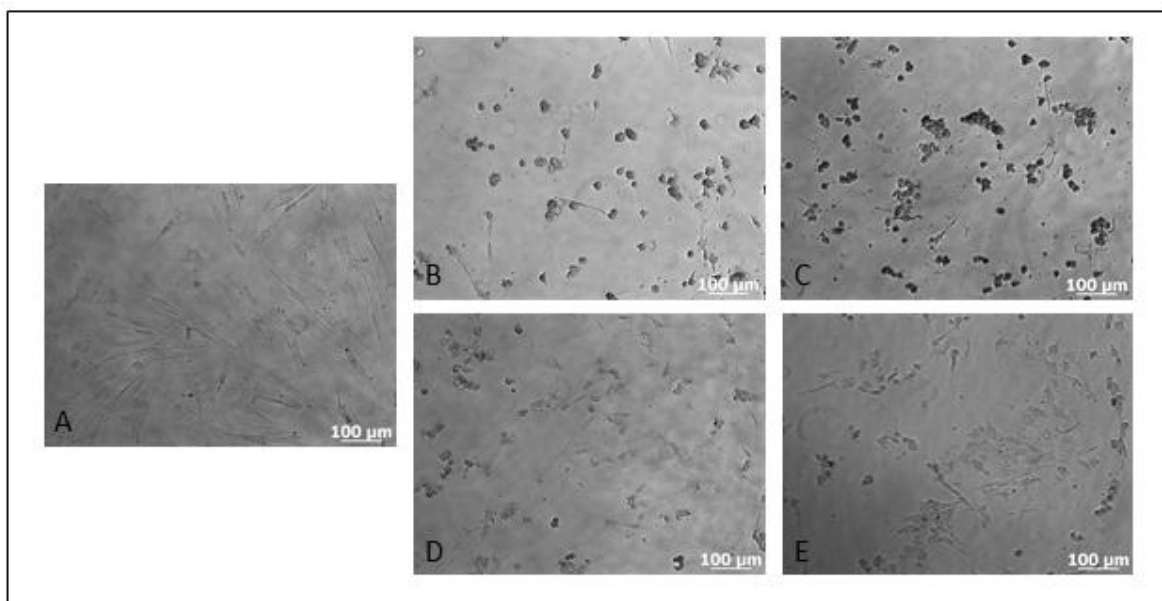


Figura 2.8 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con NaOCl a las 24 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

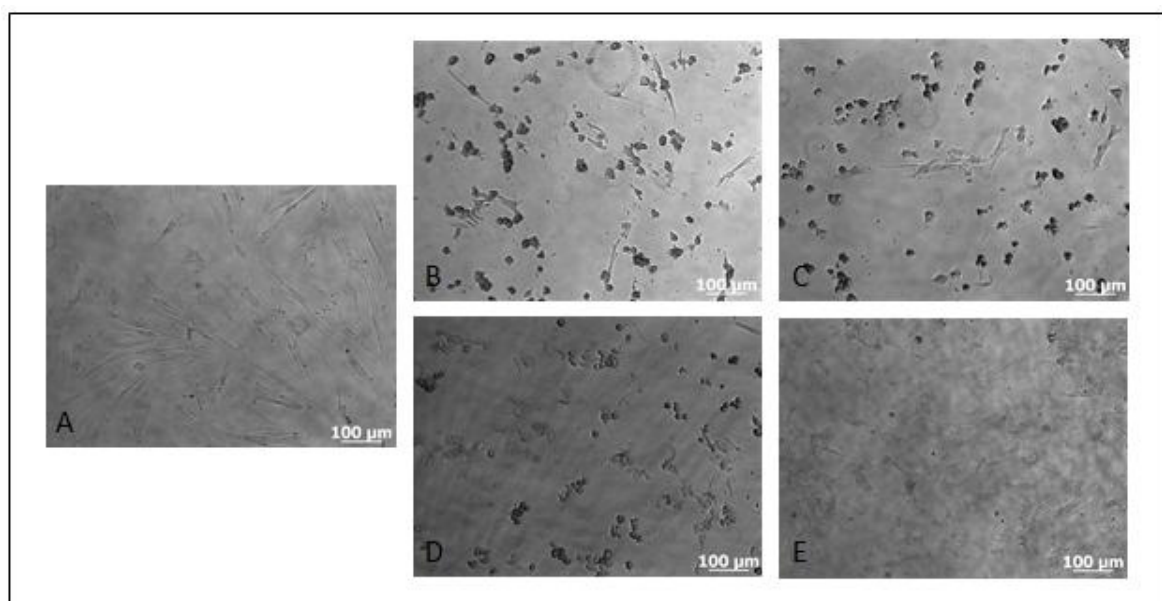


Figura 2.9 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 0.1% y distintas concentraciones de NaOCl a las 24 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

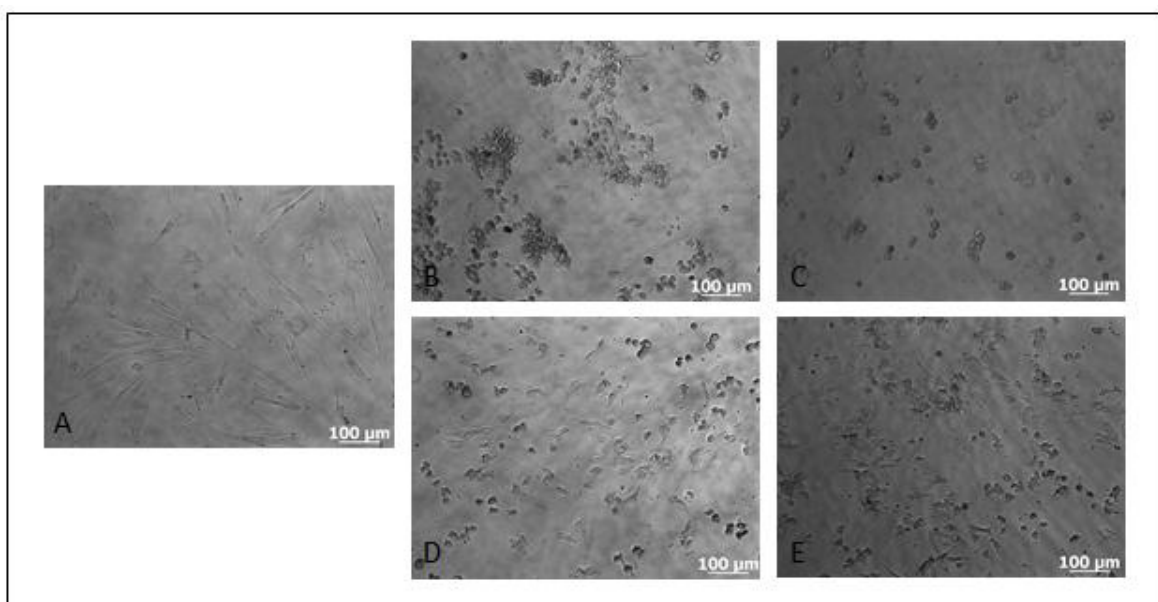


Figura 2.10 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 0.5% y distintas concentraciones de NaOCl a las 24 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

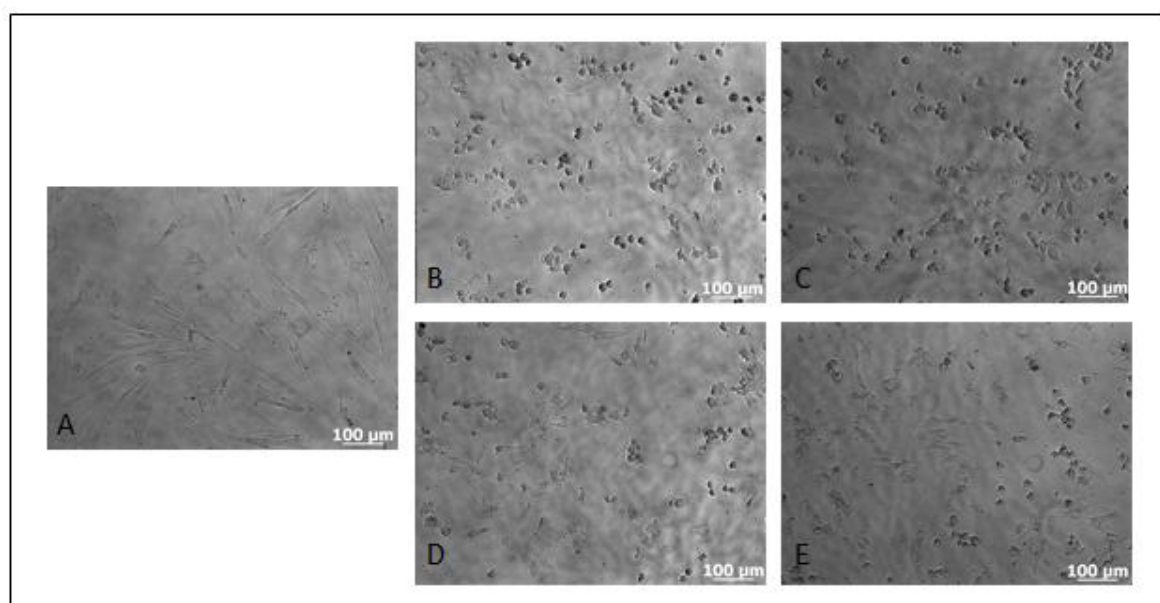


Figura 2.11 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 1% y distintas concentraciones de NaOCl a las 24 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

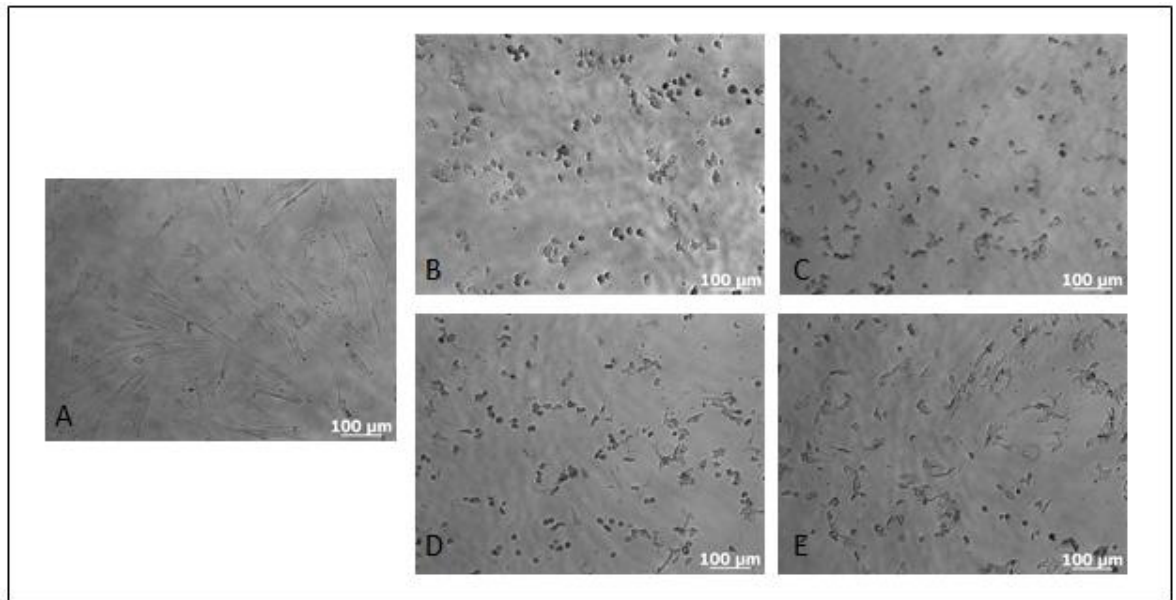


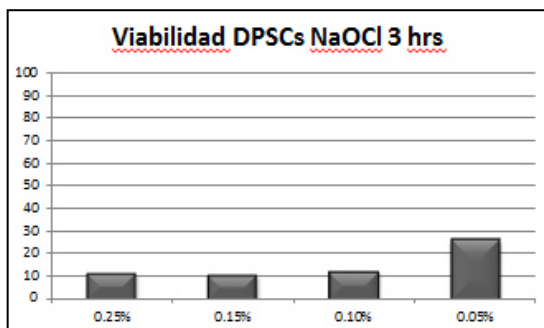
Figura 2.12 Imagen microscópica del grupo control y de células madre de pulpa dental en contacto con la combinación de EDTA 1.7% y distintas concentraciones de NaOCl a las 24 horas de exposición. A) Grupo control; B) NaOCl 0.05%; C) NaOCl 0.1%; D) NaOCl 0.15%; E) NaOCl 0.25%

9.1 Tablas y Gráficas

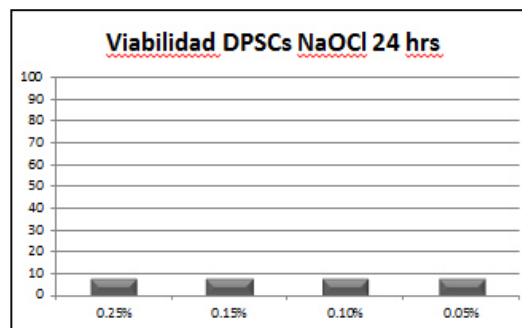
Las presentes tablas y graficas corresponden a los resultados observados de la citotoxicidad de las distintas concentraciones de NaOCl sobre las células madre de pulpa dental (DPSCs) a las 3 y 24 horas de exposición.

Concentración NaOCl	3 horas	24 horas	Control	
			3 horas	24 horas
0.25%	10.62	7.47	373333	343333
0.15%	10.17	7.66	373333	343333
0.1%	11.69	7.57	373333	343333
0.05%	25.53	7.57	373333	343333

Tabla 1. Viabilidad de DPSCs frente a NaOCl a las 3 y 24 horas de exposición.



Gráfica 1. Viabilidad de las DPSCs en contacto con NaOCl a las 3 horas de exposición

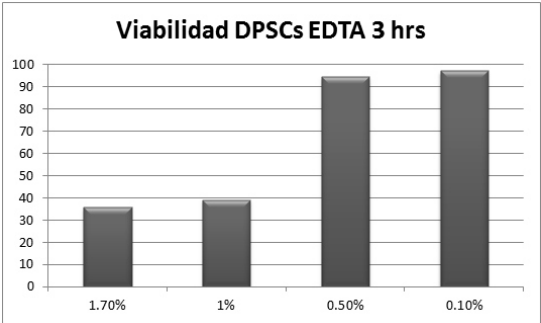


Gráfica 2. Viabilidad de las DPSCs en contacto con NaOCl a las 24 horas de exposición

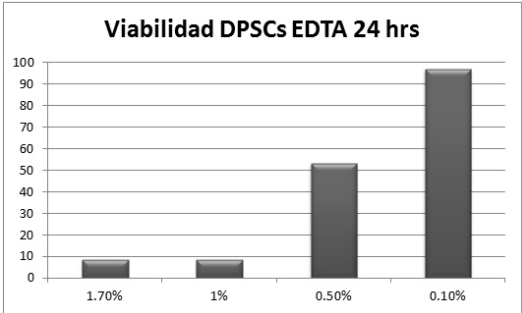
Tabla y gráficas correspondientes a los resultados observados de la citotoxicidad de las distintas concentraciones de EDTA sobre las células madre de pulpa dental (DPSCs) a las 3 y 24 horas de exposición.

Concentración EDTA	3 horas	24 horas	Control	
			3 horas	24 horas
1.7%	35.71	8.54	373333	343333
1%	39.28	8.54	373333	343333
0.5%	94.64	53.39	373333	343333
0.1%	97.32	97.08	373333	343333

Tabla 2. Viabilidad de DPSCs frente a EDTA a las 3 y 24 horas de exposición



Gráfica 3. Viabilidad de las DPSCs en contacto con EDTA a las 3 horas de exposición.

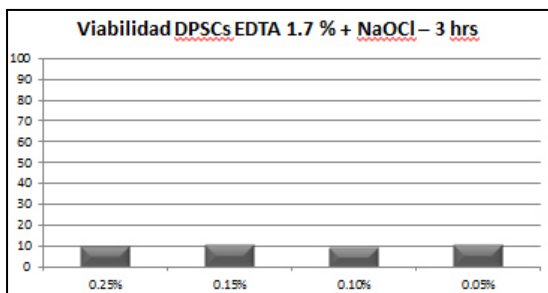


Gráfica 4. Viabilidad de las DPSCs en contacto con EDTA a las 24 horas de exposición.

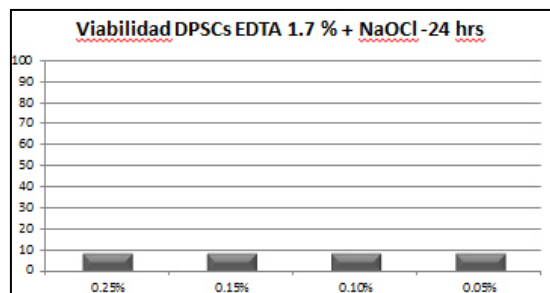
Tabla y gráficas correspondientes a los resultados observados de la citotoxicidad de la solución de EDTA al 1.7% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl sobre las células madre de pulpa dental (DPSCs) a las 3 y 24 horas de exposición.

Concentración: EDTA 1.7%+ NaOCl	3 horas	24 horas	Control	
			3 horas	24 horas
0.25%	10.17	7.57	373333	343333
0.15%	10.26	7.37	373333	343333
0.1%	9.46	7.37	373333	343333
0.05%	10.35	7.37	373333	343333

Tabla 3. Viabilidad de DPSCs frente a la solución de EDTA al 1.7% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl a las 3 y 24 horas de exposición



Gráfica 5. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 1.7% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 3 horas de exposición.

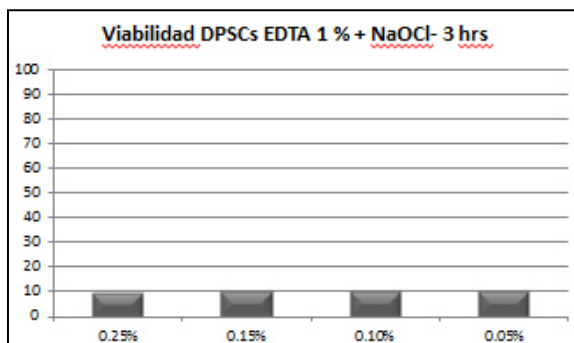


Gráfica 6. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 1.7% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 24 horas de exposición.

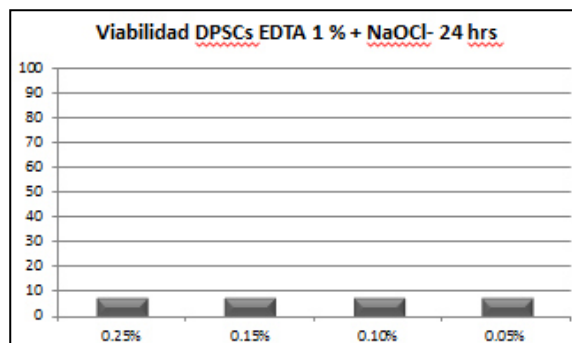
Tabla y gráficas correspondientes a los resultados observados de la citotoxicidad de la solución de EDTA al 1% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl sobre las células madre de pulpa dental (DPSCs) a las 3 y 24 horas de exposición.

Concentración: EDTA 1%+ NaOCl	3 horas	24 horas	Control	
			3 horas	24 horas
0.25%	9.28	7.28	373333	343333
0.15%	10	7.18	373333	343333
0.1%	9.64	7.28	373333	343333
0.05%	10.17	7.18	373333	343333

Tabla 4. Viabilidad de DPSCs frente a la solución de EDTA al 1% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl a las 3 y 24 horas de exposición



Gráfica 7. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 1% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 3 horas de exposición.

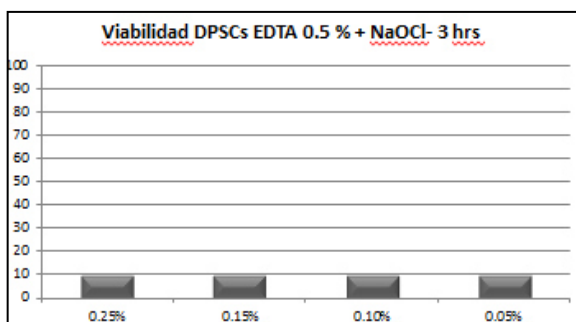


Gráfica 8. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 1% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 24 horas de exposición.

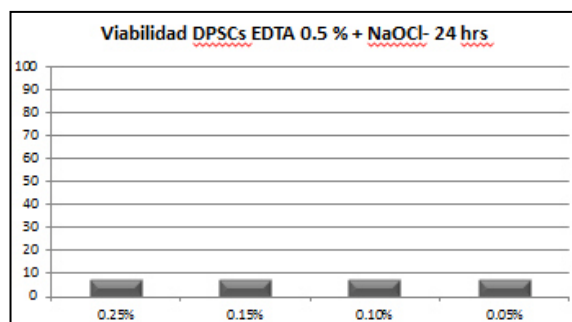
Tabla y gráficas correspondientes a los resultados observados de la citotoxicidad de la solución de EDTA al 0.5% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl sobre las células madre de pulpa dental (DPSCs) a las 3 y 24 horas de exposición.

Concentración: EDTA 0.5%+ NaOCl	3 horas	24 horas	Control	
			3 horas	24 horas
0.25%	9.46	7.28	373333	343333
0.15%	9.37	6.99	373333	343333
0.1%	9.37	6.99	373333	343333
0.05%	9.37	6.99	373333	343333

Tabla 5. Viabilidad de DPSCs frente a la solución de EDTA al 0.5% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl a las 3 y 24 horas de exposición.



Gráfica 9. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 0.5% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 3 horas de exposición.

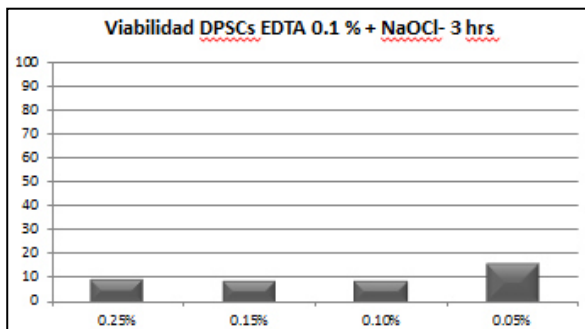


Gráfica 10. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 0.5% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 24 horas de exposición.

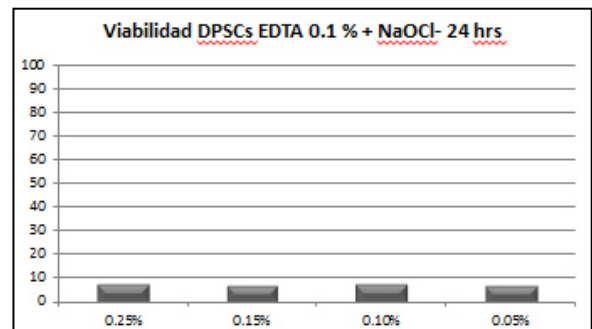
Tabla y gráficas correspondientes a los resultados observados de la citotoxicidad de la solución de EDTA al 0.1% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl sobre las células madre de pulpa dental (DPSCs) a las 3 y 24 horas de exposición.

Concentración: EDTA 0.1%+ NaOCl	3 horas	24 horas	Control	
			3 horas	24 horas
0.25%	9.37	6.79	373333	343333
0.15%	8.12	6.69	373333	343333
0.1%	8.66	6.79	373333	343333
0.05%	15.8	6.6	373333	343333

Tabla 6. Viabilidad de DPSCs frente a la solución de EDTA al 0.1% en combinación con las distintas concentraciones de NaOCl a las 3 y 24 horas de exposición.



Gráfica 11. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 0.1% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 3 horas de exposición.



Gráfica 12. Viabilidad de las DPSCs en contacto con la solución de EDTA al 0.1% en combinación con el NaOCl en sus distintas concentraciones a las 24 horas de exposición.

10. DISCUSION

En la presente investigación se estudió la citotoxicidad del NaOCl frente a las DPSCs posterior a 3 y 24 hrs de exposición, observando una alta toxicidad en dichas células. Así mismo se determinó que la combinación del NaOCl y el EDTA no disminuye el efecto citotóxico sobre las células a excepción de la combinación de EDTA .1% + NaOCl .05% la cual presentó un ligero aumento en la viabilidad celular. Por otra parte, la solución de EDTA fue menos citotóxica cuando se incubó durante 3 y 24 hrs en presencia de todas las concentraciones evaluadas.

Actualmente, existen pocas investigaciones del efecto citotóxico de las soluciones irrigantes sobre las DPSCs. Ring y colaboradores en el 2008 sugirieron que los irrigantes biocompatibles son necesarios para promover la adhesión de las DPSCs a la dentina, lo cual es esencial para llevar a cabo terapias de regeneración en endodoncia. Ellos mencionaron que la adhesión tiene alta correlación con el efecto citotóxico de las soluciones (Ring *et al.*, 2008) En nuestro estudio se exploró la posibilidad de que estas moléculas en combinación tuvieran un menor efecto citotóxico que utilizándolas por separado, mejorando así el protocolo de regeneración ya establecido.

En otro estudio elaborado por Trevino y colaboradores en el 2011 observaron la supervivencia de células madre de la papila apical (SCAP) cultivadas en especímenes de conductos radiculares previamente irrigados con EDTA 17%, NaOCl 6% + EDTA 17% + NaOCl 6%, EDTA 17% + clorhexidina 2% y NaOCl 6% + EDTA 17% + NaOCl 6% + alcohol isopropílico + clorhexidina 2%. Ellos encontraron que la irrigación con EDTA al 17% promovió una mejoría en la supervivencia celular (89% de viabilidad), seguido por la irrigación de NaOCl 6% + EDTA 17% + NaOCl 6% que presentó 74% de viabilidad celular. Por otro lado, se observó que los protocolos en los que se utilizó clorhexidina 2% no hubo viabilidad y que por lo tanto el uso de EDTA puede ser benéfico en los procedimientos regenerativos (Trevino *et al.*, 2011). En nuestro estudio no

utilizamos clorhexidina debido a que es conocida su alta toxicidad celular lo cual puede contribuir a un efecto negativo en los procesos de regeneración tisular, además nosotros probamos las moléculas sobre DPSCs a diferencia del anterior estudio que utilizaron SCAP.

Es importante mencionar que otras investigaciones han demostrado que la dentina acondicionada con NaOCl al 5% y 6% inhibe la diferenciación de DPSCs a odontoblastos tanto en modelos *in vitro* (Casagrande *et al.*, 2010) como en modelos *in vivo* (Galler *et al.*, 2011). También se ha demostrado que el efecto del NaOCl en una superficie acondicionada con dentina persiste una vez que se ha retirado el irrigante, sugiriendo que el NaOCl tiene efectos directos e indirectos en la citotoxicidad (Essner *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro proyecto encontramos que existe una combinación donde la toxicidad disminuye, lo cual podría ser interesante para mejorar la diferenciación odontoblastica de las células progenitoras residentes de la pulpa, sugiriendo con base en la literatura que las moléculas deben ser retiradas por completo o al menos en su mayoría de la matriz dentinaria a tratar.

En un reciente estudio por Martin y colaboradores en el 2014 evaluaron la viabilidad de las SCAP y además se analizó la expresión de la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) con diferentes concentraciones de NaOCl, se encontró una reducción significativa de viabilidad y expresión de la DSPP en el grupo tratado con NaOCl al 6% comparado con el grupo control no tratado. Una viabilidad comparable fue observada en los grupos tratados con menos concentración de NaOCl, pero la mejor expresión de DSPP se observó en el grupo tratado con NaOCl al 1.5%. En adición, el EDTA al 17% incrementó la viabilidad y expresión de DSPP revirtiendo el efecto negativo del NaOCl (Martin *et al.*, 2014), lo anterior coincide con nuestros resultados aunque a una escala menor debido a que se probaron las moléculas en cultivo de DPSCs.

En otro estudio también se utilizó el NaOCl y el EDTA para analizar la liberación de factores de crecimiento de la dentina, los cuales tienen efectos en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales. Dicho estudio

sugiere que el EDTA al 10% tiene un efecto positivo en su liberación. En la investigación se menciona que es necesaria la conservación de proteínas fosilizadas en la matriz extracelular dentinaria para mejorar el pronóstico del tratamiento regenerativo, garantizando de esta manera un proceso inductor exitoso (Galler *et al.*, 2015).

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados observados en el presente estudio podemos concluir lo siguiente:

- El Hipoclorito de sodio presentó alta citotoxicidad en todas sus concentraciones a las 3 y 24 horas de exposición.
- El EDTA presentó una mayor viabilidad a las 3 y 24 horas cuando se utilizó al 0.5% y 0.10%.
- La combinación del EDTA y NaOCl resultó menos citotóxica cuando se utilizó al 0.1% y 0.05% respectivamente a las 3 horas de exposición.
- Se observó un cambio morfológico de las células madre de pulpa dental en contacto con el NaOCl y EDTA.

12. REFERENCIAS

About I. Dentin regeneration in vitro: the pivotal role of supportive cells. *Adv Dent Res* 2011;23:320–4.

Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod* 2014;40:521-525.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196–200.

Batouli S, Miura M, Brahim J, et al. Comparison of stem-cell mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82:976–81.

Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 2007;213:565–73.

Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2009;35:1343–9.

Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, et al. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 2010;89:603–8.

Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, Kellerman O, Goldberg M. Pulp stem cells: Implication in reparative dentin formation. *J Endod* 2014;40:S13-S18.

Diogenes AR, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Top* 2013;28:2–23.

Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod* 2014;40:S52-S57.

Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood* 2012;120:2174–81.

Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:662–6.

Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 1990;35:707–15.

Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod* 2015;41:363-368

Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:1536–41.

Gilbert SF. The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *Int J Dev Biol* 2003;47:467–77.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625–30.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81:531–5.

Holden DT, Schwartz SA, Kirkpatrick TC, Schindler WG. Clinical Outcomes of Artificial Root-end Barriers with Mineral Trioxide Aggregate in Teeth with Immature Apices. *J Endod* 2008;34:812-817

Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration—advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;3:788–800.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those of other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009;88:792–806.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod* 2008;34:876–87.

Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005;6:1182–90.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res* 2001;15:46–50.

Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, Diógenes A. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod* 2014;40:51-55.

Martin P. Wound healing. Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276: 75–81.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807–12.

Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:463–71.

Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod* 2014;40:51–5.

Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Dev Biol* 1991;143:303–8.

Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010;36:536–41.

Qvist V. Pulp reactions in human teeth to tooth colored filling materials. *Scand J Dent Res* 1975;83:54–66.

Ring KC, Murray PE, Namerrow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod* 2008;34:1474-1479.

Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001;29:532–539.

Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol* 1995;170:457–66.

Shiba H, Fujita T, Doi N, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/ secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 1998;174:194–205.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009;42:1118–26.

- Selden HS. Apexification: an interesting case. *J Endod* 2002;28:44-45
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738–46.
- Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res* 2001;15:51–4.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth—a pilot study. *J Endod* 2008;34:166–71.
- Stradner MH, Hermann J, Angerer H, et al. Spingosine-1-phosphate stimulates proliferation and counteracts interleukin-1 induced nitric oxide formation in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:305–11.
- Tabata MJ, Matsumura T, Fujii T, Abe M, Kurisu K. Fibronectin accelerates the growth and differentiation of ameloblast lineage cells in vitro. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1673–9.
- Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, et al. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008;52:9–13.
- Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res* 2006;85:819–23.
- Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* 2011;37:1109–15.
- Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, et al. Laminin alpha2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *J Biol Chem* 2004;279: 10286–92.